Informe Trimestral

Actividades realizadas como parte de lo contemplado en acuerdo formal entre Minera Panamá S.A (MPSA) y The Houston Zoo Inc. (HZI) para la conservación y manejo *ex situ* de Especies de Interés (EdI) de Anfibios encontrados dentro del área de uso múltiple del proyecto Cobre Panamá.

Periodo
30 de Agosto al 10 de Noviembre, 2013

Presentado por:
Edgardo J. Griffith
Supervisor de Proyecto



1. Introducción

De acuerdo a lo establecido originalmente en el acuerdo formal celebrado entre Minera Panamá S.A. **(MPSA**) y The Houston Zoo Inc (**HZI**) en el cual **MPSA** se compromete a financiar en su totalidad la construcción de espacio físico en las instalaciones existentes del Centro de Conservación de Anfibios de El Valle (**EVACC,** por sus siglas en inglés) ubicado en el zoológico El Níspero, El Valle de Anton, Coclé. Adicionalmente MPSA se ha comprometido en proveer toda la coordinación logística necesaria antes, durante y después de que finalicen las actividades de rescate y translocación de Especies de Interés (**EdI**) de anfibios que ocurren dentro del área de uso múltiple del Proyecto Cobre Panamá (**PCP**).

En el antes mencionado acuerdo entre **MPSA** y **HZI**, el cual fue firmado en Marzo del 2011, ambas partes entienden la necesidad de crear espacio adicional a la infraestructura de **EVACC**, y convienen en la construcción de un anexo, que constara de dos laboratorios con suficiente espacio físico (aproximadamente 20 m^2 cada uno) para alojar a los individuos de las cuatro especies que necesitan ser rescatadas del área que será afectada por las actividades de construcción de la mina y posterior extracción de cobre del Proyecto Cobre Panamá. En estos momentos la infraestructura se encuentra lista y apta para alojar individuos de las especies que serán rescatadas.

Teniendo en cuenta que el objetivo fundamental de éste acuerdo , realizado entre MPSA y HZI es el de trabajar en colaboración para lograr rescatar especies de anfibios nativos del área del distrito de Donoso, concentrándonos en aquellas especies cuyas poblaciones se verán afectadas por las actividades de minería a desarrollarse en ésta zona, se encuentren amenazados de extinción o sus poblaciones estén experimentado declinaciones masivas en los últimos años por la acción del hongo quitridio.

En este informe se reportan las actividades más sobresalientes ejecutadas durante los tres últimos meses y que están encaminadas a lograr la ejecución y efectividad del vigente acuerdo, entre MPSA-HZI.

Como resultado de lo anterior y dado que la infraestructura se encuentra en su fase operacional, esperamos dar inicio a las actividades de rescate de las EdI de anfibios durante los días, subsiguientes a la entrega del presente informe.

2. Objetivo General

Trabajar en colaboración para lograr rescatar EdI de anfibios nativos del área del distrito de Donoso, concentrándonos en aquellas especies cuyas poblaciones se verán afectadas por las actividades del proyecto a desarrollarse en ésta zona y que se encuentren amenazados de extinción; sus poblaciones estén experimentado declinaciones masivas en el resto de su ámbito de distribución en los últimos años por la acción del hongo quitridio (*Batrachochytrium dendrobatidis*), la perdida de hábitat y/o la combinación de estos y otros factores nocivos para que dichas poblaciones se mantengan en su hábitat natural.

3. Objetivos Específicos

- La implementación de un programa preliminar de monitoreo y rescate con posterior manejo *ex situ* de las poblaciones de *Atelopus varius, Andinobates spp, Craugastor evanesco* y *Gastrotheca cornuta* que se verán afectadas.
- Búsqueda activa y generalizada de los individuos de las **EdI** de anfibios y extraerlos de su entorno natural para formar colonias saludables y viablemente reproductivas en cautiverio, a fin de garantizar la sobrevivencia de las mismas y de ser posible en el futuro, reintroducir dichas especies en ambientes saludables.
- Capacitar a biólogos y técnicos panameños con técnicas de identificación adecuadas, colecta de "frotis de piel de anfibios (swabs)", rescate y manejo de anfibios amenazados para llevar a cabo programa de manejo *ex situ.*

4. Actividades realizadas durante este periodo

En este periodo hemos dado inicios a los trabajos de campo, los cuales tienen el propósito de encontrar los individuos fundadores de las cuatro Especies de Interés de Anfibios (E**dI—Anfibios**) para el **Proyecto Cobre Panamá** y objetivo de nuestro proyecto de conservación. Los trabajos de campo consisten en visitar varias veces los diferentes sitios en los cuales sospechamos o sabemos que dichas **EdI—Anfibios** se encuentran presentes.

En el primer sitio que seleccionamos para iniciar nuestra búsqueda nocturna, y por recomendación de personal de MWH, hemos logrado encontrar mas de 20 individuos de la especie *Craugastor punctariolus.*

4.1. Sitios visitados y actividades entre Agosto y Septiembre

1. Botadero Colina, literalmente ubicado entre el Campamento Colina y la carretera que va hacia el Tajo Botija. En este sitio concentramos la búsqueda en el área de borde del bosque circunvecino a la zona talada. Se encontraron un número relativamente alto de especies de anfibios y reptiles, aunque ninguna especie de Interés. El remanente de bosque está compuesto por una mezcla de bosque maduro y bosque ripario en regeneración. La elevación del sitio no supera los 200 metros sobre el nivel del mar.

2. Coastal Road 13+800 KM a 13+000 KM, avanzada ejecutada por MWH y visitada en los meses de Agosto y Septiembre, está ubicado aproximadamente 45 minutos al Noroeste del campamento MPSA, dicho sitio consiste de un corte de carretera que se está construyendo para unir el Campamento MPSA con el sitio de Punta Rincón, en la costa del Mar Caribe, Provincia de Colon. El hábitat está compuesto de bosque primario y ripario, con varios ríos con riachuelos pequeños, nuestra búsqueda estuvo concentrada en las áreas de avanzada a lo largo del corte programado de la carretera. En ocasiones enfocamos nuestro trabajo en los cuerpos de agua y áreas inmediatas a los mismos. En ocasiones también realizamos búsqueda de las **EdI,** en el bosque a lo largo de los cuerpos de agua, sin alejarnos más de 200 metros de los mismos.

3. Sitio Saprolite Starter Dump (SSD) este es un sitio de bosque maduro, compuesto por terrenos empinados y cuerpos de agua de tamaño moderado. Las búsquedas estuvieron divididas por secciones o polígonos, en los cuales en compañía del personal de SNC Lavalin Panamá, y aprovechando su coordinación logística, logramos colectar un gran número de muestras de piel de especies de anfibios para su posterior análisis y determinar la presencia del hongo patógeno Batrachochytrium dendrobatidis en los animales de este área.

4. Sitio **North Dam Road**, este área ubicado en las riveras de El Río de El medio, en donde la empresa contratista Stracon, se encuentra realizando trabajos de construcción y adecuación de caminos para la construcción de carretera y botadero. Esta es una área extensa de terreno, el 80 % de la vegetación restante, en las áreas que visitamos, es bosque en regeneración y lo que conocemos como rastrojo. Para el momento de nuestra llegada, ya el área había sido talada por completo, por lo tanto el número de individuos encontrado fue bajo.

4.2 Sitios visitados y otras actividades realizadas en Octubre y Noviembre, 2013.

1. Sitio **Coastal Road 10 KM+200,** localizado camino a la costa del Mar Caribe, y consiste de la continuación de la carretera que unirá al Campamento MPSA con sitio de operaciones portuarias en Punta Rincón. En este sitio la empresa MWH, esta encargada de realizar los trabajos de rescate de especies de flora y fauna.

2. Sitio **Quebrada Valle Grande,** localizado dentro del emplazamiento y a pocos minutos de las oficinas de MPSA, en sitio Mina. Se trata de un área con varios afluentes y hábitat de bosque maduro. En el sitio ya habíamos encontrado la especie ***Atelopus varius*** en agostos del año 2012, por lo cual teníamos la certeza que encontraríamos nuestra especie de interés allí.
   Los trabajos consistieron en varias visitas durante el día, realizando búsqueda exhaustiva en las orillas de las diferentes quebradas que componen la cuenca hidrológica.



Foto 1. Quebrada Valle Grande, hábitat característico de *Atelopus varius*

Utilizando el método de búsqueda activa y generalizada, especifica para el tipo de hábitat ripario en el que nos encontramos, nos permitió ubicar nuestro primer individuo. Un macho adulto de la especie *Atelopus varius*, el cual se encontraba escondido en roca cubierta de musgos, líquenes y helechos arbustivos abundantes. Se colectaron en total seis especímenes.



Foto 2. Indivisuo de *Atelopus varius*, macho

A todos los animales colectados se les tomo una muestra de piel para posterior análisis de **qPCR**, con el propósito de determinar la presencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis (Bd).*

Ese mismo día todos los animales colectados fueron apropiadamente transportados a EVACC, en El Valle de Anton.



Foto 3. Contenedores con musgo y ventilación para transportar anfibios.

3. **Fresh Water Pond** Una vez evaluados y aprobados, y ya con todas las autorizaciones necesarias y logística pertinentes (comunicación y transporte con Seguridad Física MPSA, paramédico, asistente y machetero), dimos inicio a los trabajos de campo nocturnos el día Martes 5 de Noviembre en el sitio conocido

como Fresh Water Pond. Éste sitio ésta ubicado a mano izquierda, justo en la marca 5 KM + 200 del camino Pionero o Coastal Road.
La quebrada se encuentra aproximadamente 20 minutos de la carretera, atravesando y bajando por el bosque a pie. El hábitat, compuesto de bosque rivereño maduro y en regeneración, en donde pudimos observar que el lugar es objeto de un alto tráfico de personas de la comunidad de Chicheme, lo cual causa ciertos niveles de alteración al hábitat ripario, en donde se encuentra nuestra Especie de Interés.

Nuestra búsqueda en éste, uno de los cuatro sitios propuestos, rindió sus frutos la primera noche, ya que colectamos varios individuos de la especie *Craugastor evanesco.*



Foto 4. *Craugastor evanesco* encontrado en Fresh Water Pond



Foto 5. *Dendrobates auratus*, encontrado en área de 10 KM+ 200



Foto 6. ***Atelopus varius*** **Valle Grande**

Dimos inicio a los trabajos de búsqueda nocturna de *C. evanesco* la noche del 5 de Noviembre, del presente año, lo cual nos produjo un total de 8 individuos de la especie antes mencionada. En las dos noches siguientes, 6 y 7, de Noviembre logramos colectar 9 y 7 individuos mas respectivamente. En total colectamos 24 individuos de *C. evanesco* en el sitio Fresh Water Pond más 25 muestras de piel de de anfibios de otras especies del área para análisis del hongo *Batrachoshytrium dendrobatidis.*

Esperamos poder realizar las pruebas de **qPCR** lo antes posible, para lo cual esperamos contar con el apoyo de Dr. Roberto Ibañez y lograr realizar dichas pruebas en los laboratorios de Biología Molecular del Smithsonian Tropical Research Institue (STRI).

Dependiendo de la frecuencia y número de sitios donde encontremos la especie *C. evanesco*, determinaremos si es necesario volver a colectar al sitio Fresh Water Pond en el futuro próximo.



Foto 7. ***Craugastor evanesco*** **de Fresh Water Pond**

En el sitio **Fresh Water Pond** logramos trabajar durante tres noches consecutivas, obteniendo un importante y representativo número de individuos de *C. evanesco* y sus correspondiente muestras de piel para posterior análisis de PCR.

4.3 Trasporte al EVACC de los especímenes

Debido a que contábamos con 24 individuos de *C. evanesco*, mantenidos dentro del contenedor de manejo temporal en MPSA, decidimos transportarlos a El Valle para dar inicio con su periodo de cuarentena y tratamientos medicinales correspondientes.

Adicionalmente nos encontramos colectando muestras de heces de los animales y realizando monitoreos permanentes de las poblaciones de endoparásitos, para posteriormente aplicar los tratamientos correspondientes.



Foto 8. *C. evanesco*, listo para ser transportado a EVACC, en El Valle.

Para transportar a los individuos utilizamos contenedores plásticos individuales, musgo estéril sphagnum, cold packs para mantener una temperatura especifica.

Adicionalmente utilizamos un termómetro digital, con el cual podremos monitorear constantemente la temperatura interna del cooler con los animales, con el fin de hacer ajustes correspondientes.





Foto 9. Cooler con termómetro y animales dentro listo para transporte

4.4 |Tratamiento en el EVACC

En estos momentos contamos con 24 *C. evanesco* y 7, *A. varius* provenientes de dos sitios dentro de la concesión Proyecto Cobre Panama-MPSA (Quebrada Valle Grande y Fresh Water Pond). Todos los animales se encuentran tomando un tratamiento antimicótico con la solución Itraconazole al 0.005%, siguiendo el procedimiento descrito por Jones *et al* 2012, el cual ha sido ligeramente modificado y adaptado a las especies con las cuales estamos trabajando. El tratamiento consiste en proveer baño por inmersión superficial con una solución de Itraconazole de 50mg l^{-1} (en lugar de la tradicional 100 mg l^{-1}) diluido en solución isotónica de Cloruro de Sodio 0.9% Normal, por 10 minutos/10 días.



Foto 10. Asistentes durante la aplicación de tratamiento con Itraconazole 0.005%

Al tiempo que monitoreamos y controlamos otras variables como, pH, temperatura del recinto de cuarentena y de la solución, protocolo de bioseguridad y contaminación, permanecía de cada individuo en contacto con la solución por al menos 70% del tiempo.

Cada recinto y su contenido reusable es desinfectado con solución de hipoclorito de sodio al ≥ 1% (clorox comercial) y agua caliente. Para asegurarnos que se eliminan los residuos de cloro utilizamos una solución final de Thiosulfato de Sodio ($Na_2 S_2O_3$) 20 g/G suficiente para neutralizar 20 G de Clorox a 5-10 ppm.



Foto 11. Contenedores con sol. De Itraconazole aplicada a *A. varius*

El tratamiento dio inicio el día 13 de Noviembre y de acuerdo al protocolo original descrito por Nichols et al, 2000 extenderse hasta el 22 Noviembre.

Esperamos colectar suficientes datos de manera consistente para escribir y publicar nuestros resultados en una revista científica especializada. No obstante lo anterior, nuestro objetivo es lograr 90-100 % de sobrevivencia durante la aplicación del tratamiento con Itraconazole.

5. Bibliografía

1. Jones MEB, Paddock D, Bender L, Allen JL, Schrenzel MD, Pessier AP (2012) Treatment of chytridiomycosis with reduced-dose itraconazole. Dis Aquat Org 99:243-249.

2. Nichols DK, Lamirande EW, Pessier AP, Longcore JE (2000) Experimental transmission and treatment of cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (Dendrobates aura- tus and Dendrobates tinctorius). In: Baer CK, Patterson RA (eds) Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians (AAZV) and International Association for Aquatic Animal Medicine Joint Conference, New Orleans, LA, 1−21 Sep 2000. AAZV, Yulee, FL, p 42−44